

Trabalho de Conclusão de Curso

Análise do vidro bioativo do tipo algodão-lã para regeneração óssea

Giulia Ortigara Bortolini



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

**Análise do vidro bioativo do tipo algodão-lã para regeneração
óssea**

GIULIA ORTIGARA BORTOLINI

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Giulia Ortigara Bortolini

**Análise do vidro bioativo do tipo algodão-lã para regeneração
óssea**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé

Florianópolis

2018

Giulia Ortigara Bortolini

**ANÁLISE DO VIDRO BIOATIVO DO TIPO ALGODÃO-LÃ
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 03 de outubro de 2018.

Banca Examinadora:



Prof., Dr. Felipe Perozzo Daltoé,
Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof Dr^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz,
Membro

Universidade Federal de Santa Catarina



Angélica Reinheimer,
Membro

Universidade Federal de Santa Catarina

À minha mãe e minha avó, que são minha maior força e fonte de exemplo. Todo meu esforço e minhas conquistas foram e serão por vocês! Obrigada por sempre acreditarem em mim e no meu sucesso. Vocês são tudo pra mim e eu espero orgulhá-las dia-a-dia, com todo meu coração.

Com amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a minha querida UFSC, que me proporcionou um caminho e um destino muito melhores, com todas oportunidades que aqui encontrei. Aí incluo meus mestres e todos que passaram pelo meu caminho nessa escola, funcionários e pacientes. Meus mestres que me serviram de exemplo profissional e humano, especialmente professora Thaís Mageste Duque, profº Sylvio Monteiro Jr e profº Nelson Makowiecky, se eu for 1% de quem vocês são, estarei realizada.

Ao meu orientador, profº Felipe Daltoé, por ser um estimulador de pessoas. Palavras me faltam pra dizer quanto sou grata pela oportunidade de conviver contigo e de ser tua orientada. Exemplo de professor, pesquisador e educador, mas exemplo também de paixão pela vida.

Aos meus queridos e amados colegas, por terem se tornado tão especiais, por pensarem sempre em conjunto. Destaco meu grupo 13.2, por toda parceria, todas risadas e toda amizade fiel e verdadeira construída em 5,5 anos. Maksoel Stanguerlin, Bruno Pizzi e André Poletto, meus

irmãos, parceiros de madrugadas de estudo, protetores e companheiros. Helena Polmann, Evelyn Trombelli Buzzi, Victória Caroline Hess e Ana Paula Braghini, por serem minha família, as que eu sempre corri, momentos bons e ruins, todos com vocês, obrigada por tudo. A minha família em Florianópolis, Tainá Alexandra Schenal, por ter transformado minha vida. Por me fazer ver um mundo melhor e muito mais fácil. Obrigada, Tai, por toda força, toda paciência, toda partilha e todo amor que tivemos. 406 será sempre nossa casa, não importa onde estivermos. Sem você nada teria sido tão bom. A Débora Cerutti Viegas, por ser minha luz no fim do túnel, por me trazer paz, longe ou perto, por ser quem estará comigo pra sempre.

Obrigada a minha dupla de clínica, Bruna Liotto, por me ensinares tanto, por sempre ser minha alegria dos dias de sol e dos dias cinzas, obrigada pela chance de partilhar contigo esse momento da vida.

Por cada pessoa que passou pela minha vida ao longo desse tempo, podem ter certeza que vocês deixaram suas marcas e eu só guardarei momentos bons com todos. A Giulia que entrou na escola de Odontologia da UFSC não é a mesmo que está saindo, essa evolução, devo a cada um de vocês.

A minha afilhada, Carmela, por ser uma extensão do meu amor fora de mim. A meu tio, Marcos, por ter servido de exemplo de homem por toda minha vida. E por último, à minha fortaleza e motivo de tudo, mãe e Dile. É tudo por vocês e para vocês, cada manhã, cada madrugada, cada abdicação e cada investimento, toda minha vida é por vocês. Meu único objetivo é orgulhar vocês dia-a-dia, pois sei que esse é o caminho pra minha felicidade. Nunca serei grata o suficiente para vocês, e nunca conseguirei demonstrar todo meu amor, mas saibam que ele é o que me move.

“Cada um constrói, dia por dia, hora por hora, muitas vezes sem mesmo o saber, seu próprio futuro. A sorte que nos cabe na vida atual foi preparada pelas nossas ações anteriores, da mesma forma edificamos no presente as condições da existência”

Leon Denis

RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo regenerativo complexo de grande importância e controlado por interações entre células, componentes da matriz extracelular e moléculas sinalizadoras. A distribuição de agentes ativos terapêuticos, antimicrobianos e fatores de crescimento no local da ferida tem por objetivo otimizar o processo regenerativo. Há anos buscam-se materiais adequados que possam restaurar ou reproduzir um ambiente favorável e natural necessário para a regeneração mais efetiva dos mais diferentes tecidos do corpo humano. Materiais bioativos naturais ou sintéticos; aplicados sozinhos ou em combinação tem sido testados para esse fim. O objetivo do presente trabalho é analisar a capacidade de regeneração óssea do vidro bioativo tipo algodão-lã. Para isso, foram utilizados 30 ratos divididos em dois grupos: grupo vidro bioativo tipo algodão-lã e grupo controle, no qual foi implantado o material comercial Biovidro®, padrão ouro para regeneração óssea. Os materiais foram implantados em defeitos cirúrgicos realizados nas tíbias dos animais e analisados histomorfologicamente 2, 6 e 12 semanas após. Notou-se a formação de cortical óssea densa e bem formada nos dois últimos grupos, os quais também, curiosamente, apresentaram vasos sanguíneos significativos. Dentre os principais resultados, destacam-se a biocompatibilidade do material e regeneração óssea semelhante ao grupo controle.

Palavras-chave:

Vidros bioativos; biovidros; regeneração óssea.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Aspectos Éticos	22
4.2 Experimentos <i>in vivo</i>	22
4.3 Análise Histológica	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Grupo Controle (Biovidro)	29
5.2 Grupo Teste vidro bioativo tipo algodão-lã	34
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO 1	50
ANEXO 2 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA.....	51

1. INTRODUÇÃO

O reparo e a regeneração tecidual são assuntos pertinentes às mais diferentes áreas da ciência, incluindo aqui a odontologia e as suas especialidades, como a cirurgia, a implantodontia, a periodontia, dentre outras. Nessas áreas, há estudos voltados para a regeneração tanto de tecidos moles como o pulpar, por exemplo, (Cordeiro 2008) quanto de tecidos duros como a dentina (Pang 2016) e osso (Bueno et al). Quanto maior a área a ser regenerada ou reparada, maior é o desafio, principalmente pelas limitações de fornecimento vascular e de substâncias que contribuam para a formação desses novos tecidos.

Sendo assim, o uso de substâncias ou materiais que possam auxiliar nesses processos de reparo ou regeneração, oferece oportunidades interessantes para substituir ou mesmo ajudar a restaurar os tecidos do corpo perdidos ou danificados após doença e/ou trauma, por exemplo.

Esse campo do desenvolvimento de biomateriais promotores ou aceleradores desses processos biológicos reparativos ou regenerativos cresceu significativamente nos últimos 50 anos (Bellucci, Anesi, Salvatori, Chiarini, & Cannillo, 2017). Recentemente foram desenvolvidos materiais híbridos e inorgânicos que fazem papel terapêutico de entrega de substâncias e que favorecem a regeneração de tecido ósseo, chamados vidros bioativos (Bellucci et al., 2017). A descoberta de vidros bioativos (cujo nome do primeiro registro é 45S5) é atribuída a Larry Hench, professor pesquisador da Universidade da Flórida (Baino, Hamzehlou, & Kargozar, 2018). Esses materiais podem produzir uma ligação com o osso através da formação de uma camada superficial de hidrocarboneto de apatita – quando em contato com o fluido corporal – e, através da liberação de sílica solúvel e íons de cálcio, podem estimular as células osteoprogenitoras a produzir mais osso (Poollogasundarampillai et al., 2014).

As pesquisas realizadas ao longo desses mais de cinquenta anos - desde o estudo inicial de Hench em 1969 até hoje - demonstrou a versatilidade dos vidros bioativos na área da saúde, o que levou ao desenvolvimento de muitos produtos clínicos que melhoraram o bem-estar do paciente (Baino et al., 2018).

O presente trabalho visa testar um novo tipo de vidro bioativo para a regeneração de tecido ósseo. Esse material tem algumas variações inéditas na formulação química original do biovidro 45S5 e possui propriedades físicas singulares como, por exemplo, o fato de ter o aspecto filamentoso em diâmetro similar ao das fibras colágenas do corpo humano (e não pó, como o 45S5), aumentando a sua área de superfície e permeabilidade à fluidos e células. Em virtude desse aspecto filamentoso, esse novo material foi denominado vidro bioativo tipo algodão-lã. Em estudos prévios realizados *in vitro*, o material mostrou-se capaz de

formar hidroxicarbonato de apatita (tal qual faz o biovidro 45S5) e induzir a diferenciação de células mesenquimais em pré-osteoblastos, além de não apresentar efeitos citotóxicos (Poologasundarampillai et al., 2014).

Por esses e outros motivos discutidos em maior profundidade ao longo desse trabalho, o vidro bioativo tipo algodão-lã foi testado *in vivo*, no presente trabalho, para avaliar a forma como ele atua sobre a regeneração óssea.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Vidros bioativos são materiais biocompatíveis com os fluidos corporais, bioreabsorvíveis e fabricados com os mesmos componentes químicos do vidro convencional, porém em concentrações diferentes. Os primeiros vidros bioativos pertencem ao sistema vidro sol-gel ($60\text{SiO}_2 - 36\text{CaO} - 4\text{P}_2$). Isso inclui o Biovidro[®], pertencente ao sistema 45S5, que foi desenvolvido por Larry L. Hench, na Universidade da Flórida – Estados Unidos e já são utilizados, desde 1980, em diversas aplicações em clínicas médicas, bem como odontológicas (Barrioni et al., 2016).

No contexto do reparo ósseo, a bioatividade inorgânica dos vidros bioativos implica na formação rápida de uma camada superficial de apatita nano-cristalina. Essa camada acaba imitando a fase mineral de formação do osso na superfície de um implante, por exemplo.

Assim, temos uma condição prévia que favorece a ligação/deposição de mais tecido calcificado na região (Baino, Fiorilli, & Vitale-Brovarone, 2017).

Os vidros bioativos não só são capazes de formar uma camada superficial semelhante à hidroxiapatita após serem colocadas em contato com fluidos biológicos, promovendo assim uma ligação estável ao osso vivo (osteocondução), como também tem propriedades osteoindutivas, ou seja, são capazes de estimular as células ósseas em direção a um caminho de regeneração (Baino et al., 2018).

Poologasundarampillai e colaboradores, desenvolveram um material, que será o alvo deste estudo (Figura 1), o qual também é liberador de sílica solúvel e íons de cálcio, que estimulam as células osteoprogenitoras a produzir mais osso (Poologasundarampillai et al., 2014).



Figura 1- Foto mostrando o aspecto macroscópico do Vidro Bioativo do tipo algodão-lã

Atualmente, estão sendo desenvolvidas diversas variações das concentrações químicas dos principais componentes do vidro bioativo, assim como formas de apresentação físicas do mesmo, com o intuito de aprimorar o uso terapêutico desse material para as mais diferentes especificidades (Pires, Bierhalz, & Moraes, 2015). Muitas vezes, ele tem a apresentação em pó, como é o caso do Biovidro®; outras, na forma de material particulado como PerioGlass®, ou ainda semi-fluido, como o NovaBone® (NovaBone Products LLC).

Muitas vezes, esses materiais ainda requerem que sejam misturados previamente pelo cirurgião com o sangue do paciente ou solução salina para que assim possam ser pressionados no defeito cirúrgico e moldar-se ao seu tamanho e forma (Baino et al., 2018).

Recentemente Stark e colaboradores foram um dos primeiros a produzir o vidro bioativo no formato físico de fibras. Isso foi realizado pelo processo de eletrospiação (do inglês, *electrospinning*) no qual o vidro bioativo formado passa a adquirir um aspecto físico semelhante a "algodão-lã". Essa técnica possibilita a criação de um material com uma estrutura tridimensional (3D) fibrosa e flexível, passível a ser moldável aos espaços onde se deseja aplicá-las (Hild et al., 2013).

Outra especificidade do vidro bioativo tipo algodão-lã é que ele possui grandes espaços inter-fibra, os quais facilitam o desenvolvimento da vascularização local, difusão de fluidos (nutrientes) e de células por entremeio ao biomaterial (Poollogasundarampillai et al., 2014).

A composição química do vidro bioativo tipo algodão-lã desenvolvido por Poologasundarampillai et al. (2014) difere-se por ser formado por hidrólise e condensação de Sílica Tetraetilorto-silicato (TEOS) em cadeias lineares de Sílica – Oxigênio – Sílica por catálise ácida (com HCl), misturada com etanol e água. A proporção foi de TEOS:1 – Etanol:2 – Água:2 – HCl:0,01. Esse material base foi então agitado à temperatura ambiente por 24 horas e a ele adicionado moléculas de cálcio (CaO) por tetra-hidrato nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$). Sendo assim, a proporção final do biomaterial foi de 70% de SiO_2 e 30% de CaO. Ou seja, o resultado final dele era um composto binário (duas substâncias químicas) e não terciário, como o clássico biovidro 45S5 (Poologasundarampillai et al., 2014).

Além disso, os testes *in vitro* preliminares desse vidro bioativo tipo algodão-lã mostraram que, quando posto em contato com um fluido corporal simulado, a liberação de sílica pelo material foi lenta e controlada, atingindo níveis aceitáveis

in vitro, bem como, houve a formação de um composto de cálcio (Poologasundarampillai et al., 2014). Esses achados o tornam um forte candidato, portanto, aos testes *in vivo* com vistas à possível aplicação clínica futura.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso do vidro bioativo tipo algodão-lã como promotor da regeneração óssea.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Fazer testes *in vivo* para comparar a capacidade de regeneração óssea do biovidro tipo algodão-lã com o padrão ouro comercial, Biovidro®.

3.2.2. Fazer análise histomorfológica qualitativa dos tecidos ósseos formados na área de injúria e de implante do biomaterial.

3.2.3. Avaliar a biocompatibilidade do vidro bioativo tipo algodão-lã *in vivo*.

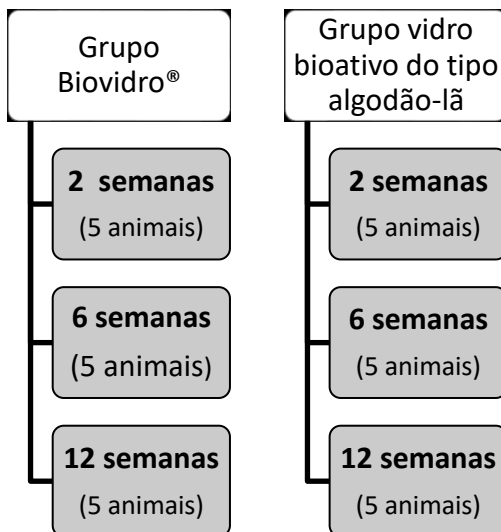
4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

O material utilizado para pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) e aprovado sob número CEUA 7717170816.

4.2 Experimentos *in vivo*

A avaliação da regeneração óssea proporcionada pelo vidro bioativo do tipo algodão-lã e pelo Biovidro® foi realizada através de um estudo *in vivo*, utilizando ratos da espécie *Rattus norvegicus*. Foram utilizados animais machos, jovens (4 - 6 semanas). A amostra total foi composta de 30 (trinta) animais, sendo 15 (quinze) do grupo de teste (biovidro do tipo algodão-lã) e 15 (quinze) do grupo controle (Biovidro®). Os animais (n= 5 por grupo) foram então acompanhados pelo período de 2 (dois), 6 (seis) e 12 (doze) semanas, sendo que em cada período, um grupo controle e um grupo vidro bioativo tipo algodão-lã (Fluxograma 1).



Fluxograma 1. Esquema representando a alocação dos animais nos diferentes grupos e tempos de análise.

O material teste vidro bioativo tipo algodão-lã e o material de controle foram colocados em defeitos cirúrgicos realizados no osso tíbia da pata traseira esquerda dos animais.

Para isso, os animais foram anestesiados com anestesia geral com anestésico Cetamina 10% (100mg/kg) em combinação com Xilazima 2% (10mg/kg), ambos por via intraperitoneal (IP) e analgésico opióide Tramadol (5mg/kg) por via subcutânea, sob orientação de Médico Veterinário.

Para a realização do defeito cirúrgico na pata, foi feita tricotomia na região a ser operada em cada animal com o auxílio de uma navalha, seguida de antissepsia com *Rioex* 2%. Após, a incisão na pele foi realizada com lâmina de bisturi nº 12, na extensão de aproximadamente 2 (dois) centímetros. Após a incisão, o músculo que recobre a parte plana e distal do osso tíbia foi afastado com instrumental cirúrgico (Figura 2 – A) e, na área de osso exposta, foi realizada uma lesão com broca esférica cirúrgica multilaminada nº 8, acoplada em peça reta e micro motor de uso odontológico, em baixa rotação, sob constante irrigação com soro fisiológico estéril (Figura 2 – B). Todas as lesões tiveram o diâmetro e a profundidade equivalente ao tamanho da parte ativa da broca (Figura 2 – C).

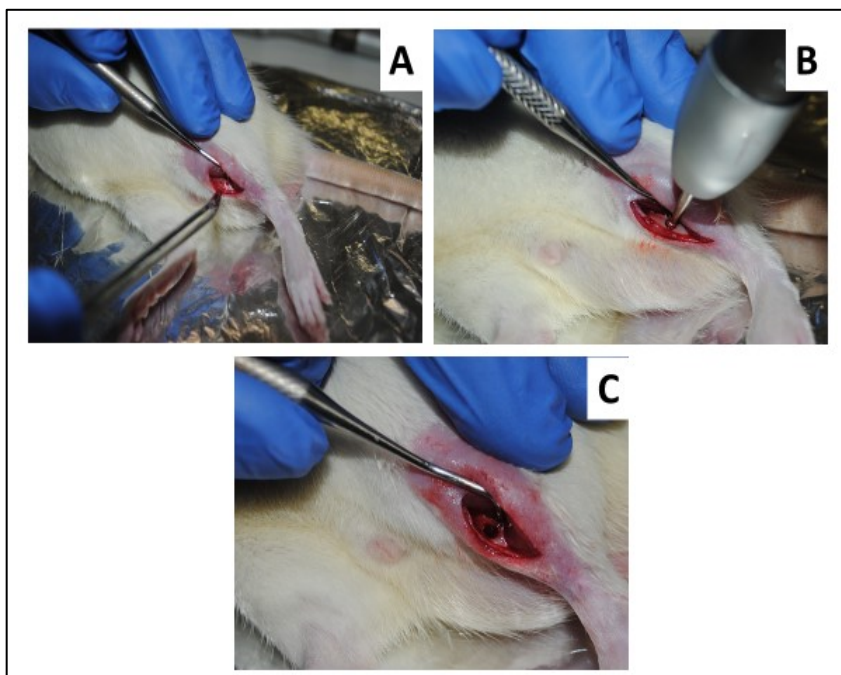


Figura 2 - A) Incisão da pata traseira do animal com exposição do osso tíbia. 2 – B) Broca esférica multilaminada acoplada em motos de baixa rotação. 2 – C) Ferida cirúrgica padronizada em todos animais com a parte ativa da broca.

Os biomateriais foram levados até à lesão com auxílio de uma cureta de dentina nº 5, em quantidade suficiente para preencher o defeito cirúrgico (Figura 3 – A e 3 – B). Após o implante do material, o tecido muscular foi reposicionado naturalmente sobre a lesão e a pele foi suturada com porta-agulha e fio de sutura 3-0 nylon (Technyl®).

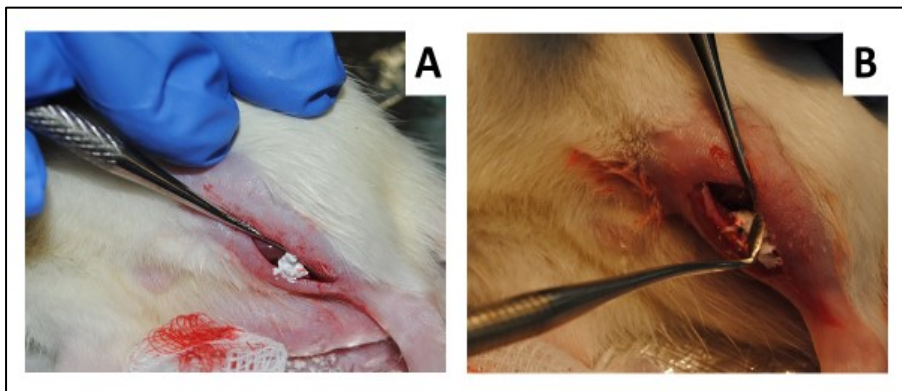


Figura 3 - A) Biovidro® sendo levado à lesão óssea com auxílio de cureta de dentina-3 - B) Vidro biotivo do tipo algodão-lã sendo levado à lesão óssea com auxílio de espátula de resina.

O animal foi então cuidadosamente levado a uma caixa com maravalha, próximo a fonte de calor de luz incandescente para que mantivesse sua temperatura corporal estável até passar o efeito da anestesia. Também foi colocado gaze umedecida em soro fisiológico sob os olhos do animal durante esse período, com o objetivo de precaver o ressecamento dos mesmos.

Imediatamente após o término da cirurgia, o animal recebeu uma injeção de antibiótico Penicilina G (22000 UI/kg), por via IP, e foi colocado em gaiola juntamente com mais 2 animais. A gaiola foi identificada como sendo grupo controle (Biovidro®) ou grupo vidro bioativo tipo algodão-lã. Para maior segurança, os animais do grupo vidro bioativo tipo algodão-lã ainda receberam uma marcação na cauda feita à caneta.

Complementando o protocolo analgésico, durante os três primeiros dias, os animais receberam analgésico Paracetamol (0,4mg/500ml) por via oral, diluído em sua água de beber.

Foi realizada através de aprofundamento anestésico seguido de deslocamento cervical. Durante todo o período do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas contendo no máximo 3 (três) animais por gaiola.

Após eutanásia, o osso tíbia dos animais onde houve a intervenção foi fixado em formol a 10% em quantidade de aproximadamente 10x o volume da amostra, por pelo menos 48h horas e processado para análise histológica.

4.3 Análise Histológica

O primeiro passo foi a descalcificação das amostras em solução de EDTA seguido da definição do plano de análise por meio da secção da tíbia do animal no sendo transversal.

Após, o material foi desidratado em cadeia crescente de etanol (álcool, 70, 80, 90 e 100%), diafanizado em xilol e incluído em parafina. Cada banho teve duração de 90 (noventa) minutos cada. O material foi inteiramente seccionado em micrótomo à 3μ de espessura e corado com hematoxilina e eosina.

As imagens foram adquiridas através de uma câmera digital de captura acoplada a um microscópio óptico.

5. RESULTADOS

5.1 Grupo Controle (Biovidro®)

Duas semanas após o implante do biomaterial, pode-se observar formação de trabéculas ósseas jovens na área injúria (Figura 1.A e 1.C). Essas trabéculas estão distribuídas uniformemente ao longo de toda a área do defeito cirúrgico realizado e são intermeadas por espaços medulares contendo tecido conjuntivo fibroso e células inflamatórias monomorfonucleares. Com frequência, observam-se áreas com material enegrecido, sugestivo de remanescentes do Biovidro® implantado (Figura 1.B e 1.D).

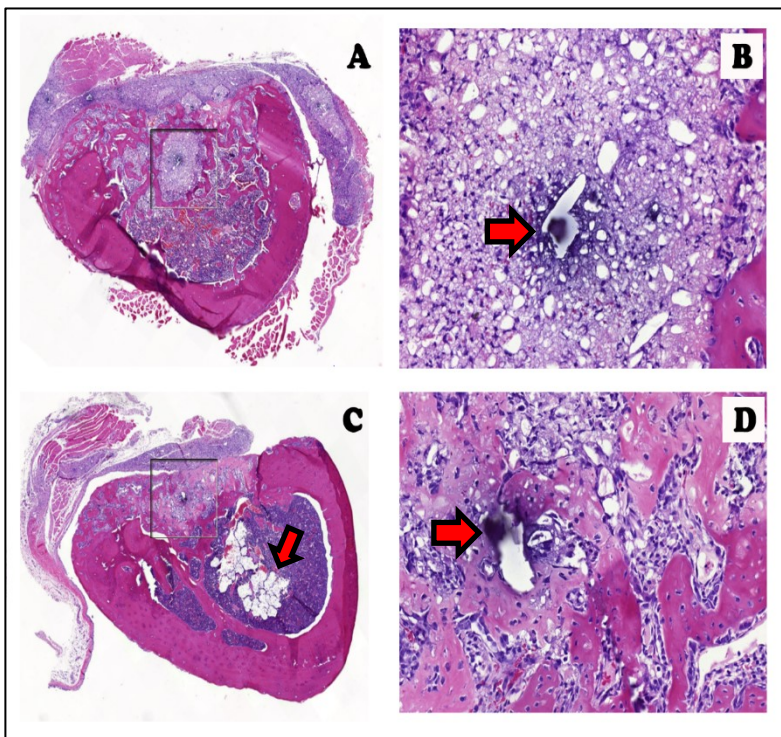


Figura 1 – Grupo Biovidro® após 2 semanas de acompanhamento. Figuras A e C mostrando cortes histológicos transversais do osso tíbia corados em HE. Presença marcante de trabéculas ósseas jovens se formando na área da injúria (Figuras A e C). Em algumas áreas, observa-se material refringente sugestivo de ser remanescente do Biovidro® implantado (Figuras B e D, setas). O biomaterial ora está circundado por tecido conjuntivo fibroso (Figura B), ora diretamente em contato com o tecido ósseo neoformado (Figura D). Em algumas outras áreas, observam-se espaços contendo um material reticular sugestivo de ser derivado da dissolução do Biovidro® (Figura C, seta) (Figura A e C, 25x magnitude, Figuras B e D, 400x).

Na sexta semana, ao passo que algumas amostras apresentam grande quantidade de trabéculas ósseas na região do defeito cirúrgico (Figura 2.A) com cortical óssea em passos largos de formação (Figura 2.B), outras ainda apresentavam a região operada predominantemente ocupada por tecido conjuntivo fibroso (Figura 3.C), por vezes ainda com indícios de remanescentes do biomaterial e baixa celularidade (Figura 3.D).

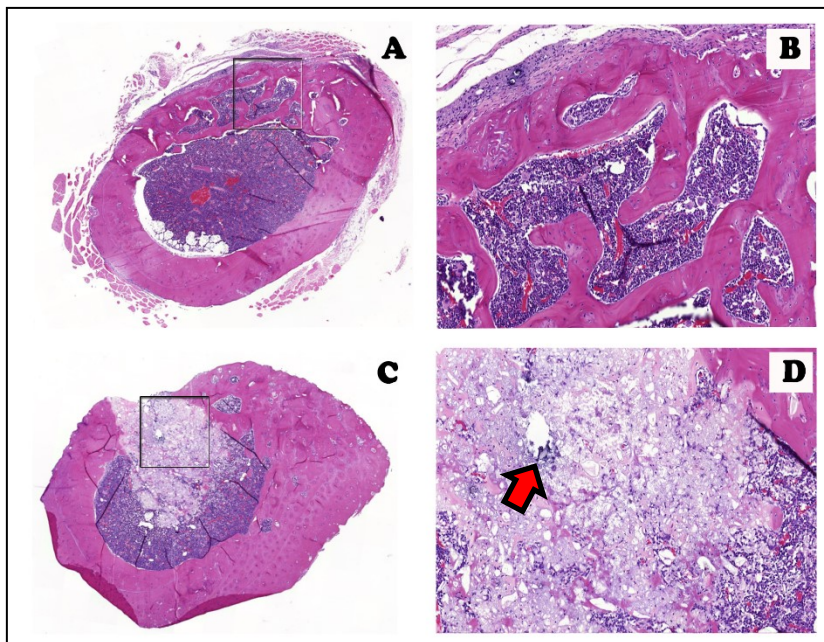


Figura 2 – Grupo Biovidro® após 6 semanas de acompanhamento. Figuras A e C mostrando cortes histológicos transversais do osso tíbia corados em HE. Trabéculas ósseas se formando ao longo de toda a área da injúria (Figura A). Em maior detalhe, presença de cortical óssea externa contínua, assim como presença de espaços medulares contendo células inflamatórias, mais internamente (Figura B). Amostras apresentando ausência de formação de osso na área de injúria (Figura C). Ao invés, tecido conjuntivo fibroso frouxo e vestígios do biomaterial implantado (Figura D, seta) (Figuras A e C, 25x de magnificação; Figura B e D, 200x).

Na décima segunda semana de acompanhamento, observou-se regeneração completa da cortical óssea na maioria das amostras (Figura 3.A, B e C). No entanto, ainda foi possível observar áreas do tecido ósseo com amplos espaços medulares (Figura 3.B) e áreas de tecido conjuntivo fibroso contendo remanescentes do biomaterial (Figura 3.C e D).

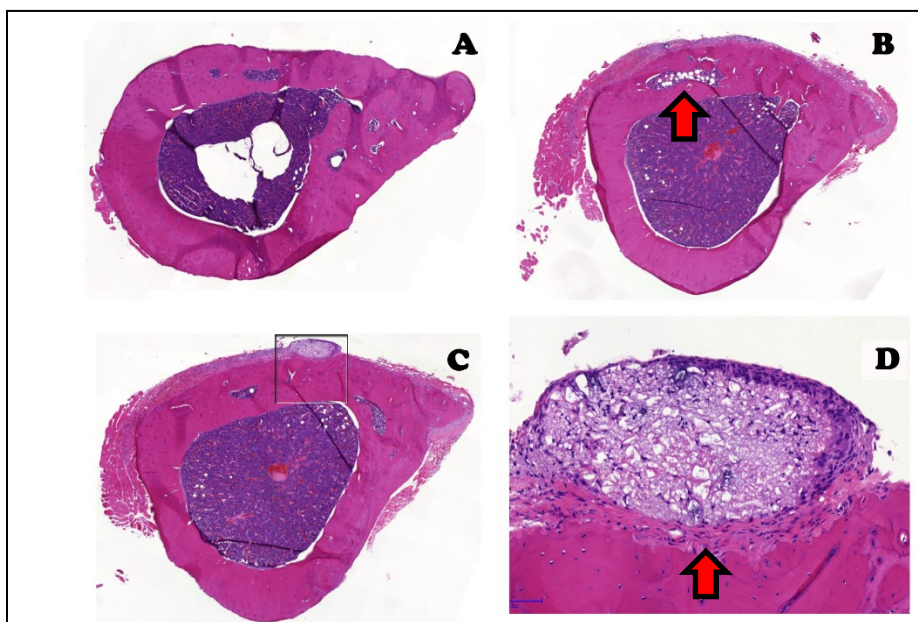


Figura 3 – Grupo Biovidro® após 12 semanas de acompanhamento. Figuras A, B e C mostrando cortes histológicos transversais do osso tíbia corados em HE. Amostras evidenciam a formação completa de tecido ósseo na área da injúria (Figuras A, B e C). Na Figura B, no entanto, fica evidente que ainda há espaços medulares amplos em algumas áreas (seta). Na Figura C, observa-se que, apesar do tecido ósseo estar bem formado, ainda existem áreas com tecido conjuntivo frouxo contendo remanescentes de biomaterial (Figura D, seta). (Figuras A, B e C, 25x de magnificação; Figura D, 400x).

5.2 Grupo Teste - vidro bioativo tipo algodão-lã

No grupo acompanhado por duas semanas, foi observado uma neoformação óssea ao longo de toda a área da injúria em duas das três amostras analisadas (Figura 4.A e 4.B). Em uma amostra (Figura 4.C) foi observado que a área da injúria estava predominantemente preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Ainda nesta mesma amostra, foi possível observar espaços contendo material reticular sugestivo de serem remanescentes das fibras do vidro

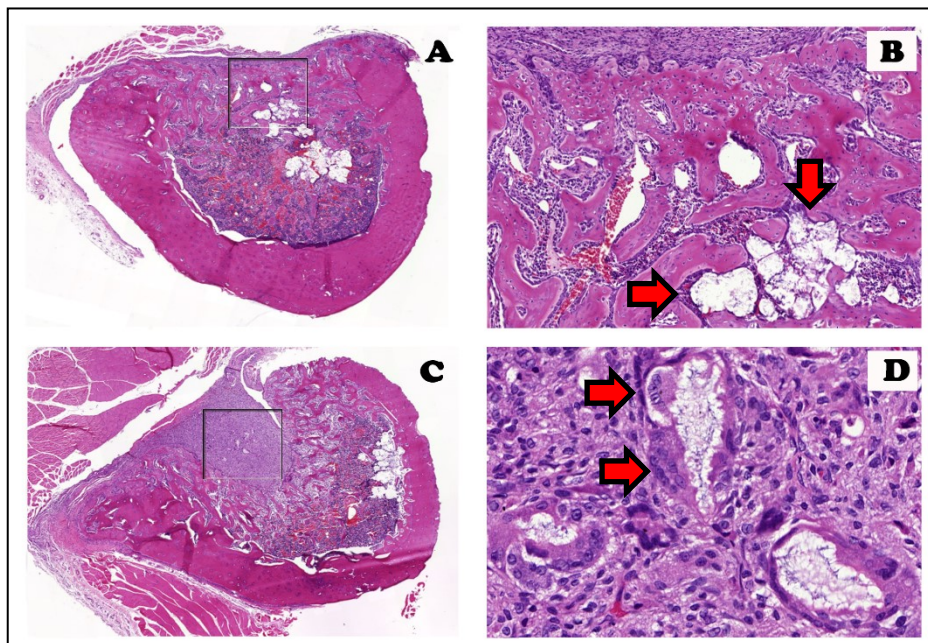


Figura 4 – Grupo vidro bioativo tipo algodão-lã após 2 semanas de acompanhamento. Figuras A e C mostram cortes histológicos transversais do osso tíbia corados em HE. Observam-se trabéculas ósseas jovens se formando na área da injúria (Figura A). Em algumas áreas (setas) observam-se espaços contendo material reticular sugestivo de ser o biovidro tipo algodão-lã implantado ou os produtos da sua dissolução (Figura B). Em uma amostra, observou-se predomínio de tecido conjuntivo fibroso na área da injúria (Figuras C e D) o qual também continha áreas sugestivas de conterem remanescentes do material implantado, por vezes circundadas por células gigantes multinucleadas (setas) (Figura A e C, 25x magnitude; Figura B, 200x e Figura D, 400x).

Na sexta semana, observou-se osso cortical densamente formado na área da injúria em todas as amostras analisadas (Figura 5.A). De maneira intrigante, foi observado também, com muita frequência, presença de vasos sanguíneos no espaço medular desse grupo (Figura 5.B, setas).

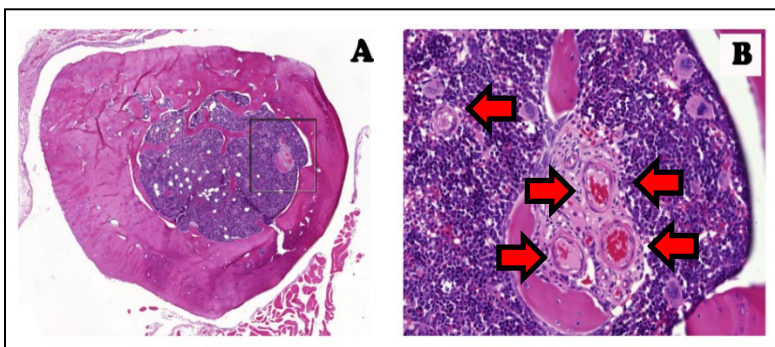


Figura 5 – Grupo vidro bioativo tipo algodão-lã após 6 semanas de acompanhamento. Figuras A mostra corte histológico transversal do osso tíbia corado em HE. Observa-se neoformação de tecido ósseo ao longo de toda a área da injúria, com a cortical óssea contínua e bem formada (Figura A). Em algumas áreas do espaço medular (setas), observou-se presença de vasos sanguíneos no grupo que recebeu o vidro bioativo tipo algodão-lã (Figuras B). (Figura A 25x magnitude e Figura B, 200x).

Via de regra, no grupo de animais que permaneceu com o vidro bioativo tipo algodão-lã por doze semanas, todas as amostras continham a área cortical da injúria completamente regenerada, com a formação uniforme de tecido ósseo denso (Figura 6.A). Uma das amostras, no entanto, apresentou área focal contendo espaços medulares avantajados (Figura 6B). As amostras desse grupo de animais também possuíam, com muita frequência, presença significativa de vasos sanguíneos no espaço medular (Figura 6.C).

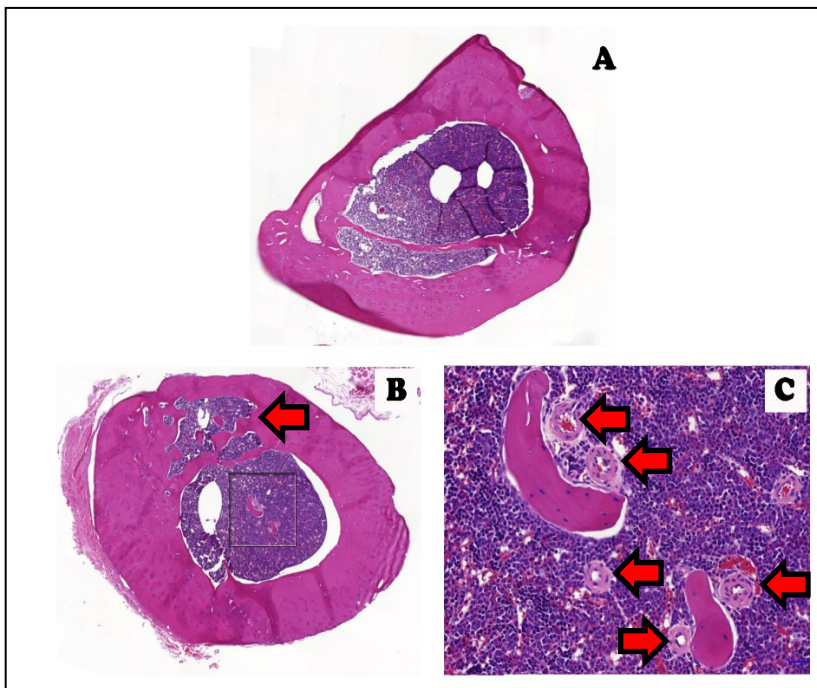


Figura 6 – Grupo vidro bioativo tipo algodão-lã após 12 semanas de acompanhamento. Figuras A e B mostram corte histológico transversal do osso tíbia corado em HE. De maneira geral, observa-se neoformação de tecido ósseo ao longo de toda a área da injúria, com a cortical óssea contínua e bem formada (Figura A). Em uma das amostras, no entanto, observou-se espaços medulares amplos na área da neoformação óssea (Figura B, seta). Grande número de vasos sanguíneos no espaço medular (Figura C, setas). (Figura A e B, 25x magnitude; Figura C, 200x).

6. DISCUSSÃO

A complexidade da arquitetura e da função de cada um dos tecidos que compõem o corpo humano traz desafios significativos para a indução do seu reparo ou regeneração (Cordeiro et al., 2008).

O uso de biomateriais visa criar um ambiente que mimetize ao máximo o ambiente fisiológico e induza as células do próprio organismo a se proliferarem e se diferenciarem no tecido desejado (Raftery et al., 2017).

No caso do tecido ósseo, esse ambiente natural é composto por uma matriz extracelular fibrosa de colágeno, secretada e mineralizada pelos osteoblastos e que contem fosfato de cálcio mineralizado (Rezende et al., 2017). Os materiais que visem fazer o processo de regeneração desse ambiente devem ser, idealmente, portanto, biocompatíveis, bioativos (estimular a formação de osso) e bioreabsorvíveis, mantendo a estrutura ou promovendo a formação da matriz extracelular original (Baino et al., 2018).

Nesse sentido, os vidros bioativos vem sendo utilizados com sucesso pela indústria médica e odontológica, e estudados pelo meio acadêmico, pois parecem muito promissores para acelerar e dar suporte à regeneração de diferentes tecidos, em especial ao ósseo. Esses materiais tem a capacidade de formar cristais de apatita que mimetizam as primeiras fases de mineralização da matriz colágena e funcionam, portanto, como um estopim para o início do processo de formação do tecido ósseo (Baino et al., 2018).

O primeiro vidro bioativo descoberto foi o 45S5 Bioglass® ($\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$) o qual ainda continua sendo usado até os dias atuais como referência e padrão ouro. Esse material libera íons (Si, P, Ca) que induzem formação inicial de hidroxiapatita, a qual funciona com precursor do neocrescimento ósseo (Bellucci et al., 2017). No caso do vidro bioativo tipo algodão-la, a sua composição química é modificada (70% de SiO_2 e 30% de CaO) e, ainda assim, tem como produto final a formação de hidroxiapatita (Poologasundarampillai et al., 2014).

Além disso, do ponto de estrutura física, a maioria dos vidros bioativos desenvolvidos até o momento são bidimensionais (2D), e contém um pequeno espaçamento entre as suas estruturas, o que dificulta a perfusão de fluidos corpóreos e células necessárias para regenerar os tecidos. Já os vidros bioativos sintetizados na forma fibrosa (tais quais os vidros bioativos do tipo algodão-lã) criam arcabouços em três dimensões (3D) que facilitam esses processos. No caso do vidro bioativo tipo algodão-lã, em especial, o mesmo foi desenvolvido de maneira pioneira com um diâmetro semelhante ao das fibras colágenas do corpo humano, esperando que isso mimetizasse a estrutura física da matriz colágena do tecido ósseo (Poologasundarampillai et al., 2014).

Outra propriedade física interessante que pode ser observada, é o fato do vidro bioativo tipo algodão-lã ter um aspecto semelhante ao algodão-lã o que permite que ele seja facilmente manipulável e moldável aos defeitos ósseos onde é aplicado.

Em nosso trabalho, a alta capacidade de maleabilidade e a facilidade com que o material podia ser manipulado eram infinitamente superiores ao Biovidro®. Este último, por ser na composição de pó, era difícil de ser transferido para o defeito cirúrgico e compactado na cavidade.

Esta pesquisa analisou de maneira pioneira o uso *in vivo* do vidro bioativo do tipo algodão-lã em comparação ao uso de Biovidro®. Os resultados mostraram que, no grupo teste, com acompanhamento de duas semanas, pode ser observado uma neoformação óssea na área da injúria, semelhante ao observado nas amostras preservadas pelo mesmo período no grupo Biovidro®.

No entanto, em casos pontuais, pode-se dizer que a área central do defeito cirúrgico se encontrou preenchida, predominantemente, por tecido conjuntivo fibroso, circundada por trabéculas ósseas. Coincidentemente, justamente nas amostras onde observam-se essas áreas de tecidos conjuntivo, notou-se presença de áreas contendo material com formato reticular, sugestivo de serem fibras remanescentes do vidro bioativo tipo algodão-lã.

Via de regra, com o passar do tempo (seis e doze semanas) no grupo de animais que permaneceu com o vidro bioativo tipo algodão-lã, todas as amostras continham a área cortical da injúria completamente regenerada, com formação uniforme de tecido ósseo denso. No entanto, de maneira similar ao grupo Biovidro®, amostras pontuais continham áreas focais de espaços medulares avantajados. De maneira interessante, somente no grupo com o vidro bioativo tipo algodão-lã foi observado a presença de vasos sanguíneos no espaço medular.

A presença de neovasos em áreas de implante de vidros bioativos já foi observada por outros autores que utilizaram o Biovidro®, e notaram que o mesmo, estimulou um aumento significativo na secreção de um fator de crescimento no endotélio vascular de miofibroblastos (Keshaw et al., 2009). Em nosso trabalho, no entanto, tal evento só foi observado no grupo que fez uso do vidro bioativo tipo algodão-lã o que o torna promissor para investigação futura como um possível candidato para promover angiogênese.

Além disso, comprovou-se que esse novo vidro bioativo (vidro bioativo tipo algodão-lã) é um material biocompatível, ou seja, não houve imunorejeição, já que não foi observado sinais clínicos de inflamação além de que no grupo teste verificou-se a formação de tecido ósseo de maneira semelhante ao observado do grupo controle (Biovidro®).

Como perspectivas futuras, o presente trabalho trouxe indícios de que o vidro bioativo tipo algodão-lã pode ser utilizado para regeneração óssea de maneira semelhante ao material padrão ouro disponível no mercado até o momento, Biovidro®, e, quiçá, como promotor de vasculogênese tecidual.

7. CONCLUSÃO

Esse trabalho permite concluir que o vidro bioativo do tipo algodão-lã foi um material biocompatível e efetivo em promover regeneração óssea de forma qualitativa semelhante ao grupo controle Bioglass®.

REFERÊNCIAS

Amaral, M. B. do. (2013). Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e micromografia computadorizada. *Tese*, 112.

Baino, F., Fiorilli, S., & Vitale-Brovarone, C. (2017). Composite Biomaterials Based on Sol-Gel Mesoporous Silicate Glasses: A Review. *Bioengineering*, 4(1), 15.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering4010015>

Barrioni, B. R., Oliveira, A. C. X., Oliveira, A. A. R., Pereira, M. M., Engenharia, E. De, Federal, U., ... Horizonte, B. (2016). Síntese sol-gel de scaffolds porosos de vidro bioativo com adição de agente porogênico (Sol-gel synthesis of bioactive glass porous scaffolds. *Cerâmica*, 62, 328–337.
<https://doi.org/10.1590/0366-69132016623642031>

Bellucci, D., Anesi, A., Salvatori, R., Chiarini, L., & Cannillo, V. (2017). A comparative in vivo evaluation of bioactive glasses and bioactive glass-based composites for bone tissue repair. *Materials Science and Engineering C*, 79, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.062>

Chen, S., Liu, B., Carlson, M. A., Gombart, A. F., Reilly, D. A., & Xie, J. (2017). Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine*, nnm-2017-0017. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0017>

Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., ... Nör, J. E. (2008). Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *Journal of Endodontics*, 34(8), 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.04.009>

Hild, N., Tawakoli, P. N., Halter, J. G., Sauer, B., Buchalla, W., Stark, W. J., & Mohn, D. (2013). PH-dependent antibacterial effects on oral microorganisms through pure PLGA implants and composites with nanosized bioactive glass. *Acta Biomaterialia*, 9(11), 9118–9125. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.030>

Keshaw, H., Georgiou, G., Blaker, J. J., Forbes, A., Knowles, J. C., & Day, R. M. (2009). Assessment of polymer/bioactive glass-composite microporous spheres for tissue regeneration applications. *Tissue Engineering. Part A*, 15(7), 1451–1461. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0203>

Kumar, S. S. D., Rajendran, N. K., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2018). Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer based biomaterials for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2017), #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.003>

López-Noriega, A., Arcos, D., Izquierdo-Barba, I., Sakamoto, Y., Terasaki, O., & Vallet-Regí, M. (2006). Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration. *Chemistry of Materials*, 18(13), 3137–3144. <https://doi.org/10.1021/cm060488o>

Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K., & Moraes, Â. M. (2015). Biomaterials: Types, Applications, and Market. *Química Nova*, 38(7), 957–971. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

Poollogasundarampillai, G., Wang, D., Li, S., Nakamura, J., Bradley, R., Lee, P. D., ... Jones, J. R. (2014). Cotton-wool-like bioactive glasses for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 10(8), 3733–3746. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.020>

Rafferty, R. M., Mencía Castaño, I., Chen, G., Cavanagh, B., Quinn, B., Curtin, C. M., ... O'Brien, F. J. (2017). Translating the role of osteogenic-angiogenic coupling in bone formation: Highly efficient chitosan-pDNA activated scaffolds can accelerate bone regeneration in critical-sized bone defects. *Biomaterials*, 149, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.036>

Venugopal, J. R., Zhang, Y., & Ramakrishna, S. (2006). In Vitro Culture of Human Dermal Fibroblasts on Electrospun Polycaprolactone Collagen Nano fibrous Membrane. *Artificial Organs*, 30(6), 440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2006.00239.x>

Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 3 dias do mês de outubro de 2018, às 12:00 horas, em sessão pública no auditório de graduação desta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Felipe P Daltoé e pelos examinadores:

1 – Ariadne da Cruz,

2 - Angélica Reinheimer,

A aluna Giulia Ortigara Bortolini apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado " Análise do vidro bioativo do tipo algodão-lã para regeneração óssea", como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela aprovação do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

Felipe P Daltoé
Presidente da Banca Examinadora

[Assinatura]
Examinador 1

Angélica Reinheimer
Examinador 2

[Assinatura]
Aluno

ANEXO 2 - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de arcabouços de vidro bioativo para regeneração óssea.", protocolada sob o CEUA nº 7717170816, sob a responsabilidade de **Felipe Perazzo Daltoé** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 23/11/2016.

We certify that the proposal "Avaluation of bioactive glass scaffolds for bone regeneration.", utilizing 30 Heterogenics rats (30 males), protocol number CEUA 7717170816, under the responsibility of **Felipe Perazzo Daltoé** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2016** a **09/2018**

Área: **Ciências Morfológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 6 semanas**

N: **30**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **50 a 200 g**

Resumo: O desenvolvimento de estratégias que estimulem a regeneração óssea em casos de perda óssea por doenças ou trauma é ponto chave para melhor recuperação dos pacientes. O presente trabalho visa investigar a eficácia de arcabouços de vidro bioativo na estimulação da regeneração óssea em um leito cirúrgico. Estudos in vitro mostram que o vidro bioativo no formato algodão-lã parece apresentar vantagens bio-físico-químicas sobre os demais biomateriais descritos na literatura tais como, criar estruturas 3D maleáveis (moldáveis), biocompatíveis e bioestimuladoras. No entanto, ainda não existem testes in vivo para avaliar a aplicabilidade clínica do material. Para isso, serão utilizados dois grupos de animais (n=15 ratos/grupo = total 30 animais) os quais receberão, em uma área de injúria óssea em tibia, o implante ora do vidro bioativo (grupo experimental) ora de Actifuse (Grupo Controle). Os animais serão analisados 2, 6 e 12 semanas após receberem os enxertos e os seus tecidos serão submetidos a análises histológica convencional (embocamento em parafina, cortes em micrômetro e coloração com hematoxilina e eosina) e histomorfométrica em micro-CT scan.

Local do experimento: Biotério Experimental BIO no024 - Laboratório de Nutrição Experimental, Bloco JK, sala 304, 4o andar, CCS, Departamento de Nutrição.

Florianópolis, 23 de novembro de 2016

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Aderbal Silva Aguiar Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina